

PRODUCTION OF POLYESTER COPOLYMER

Patent number: JP5023189
Publication date: 1993-02-02
Inventor: DOI YOSHIHARU; KOYAMA NAOYUKI; HIRAMITSU MASAYA
Applicant: MITSUBISHI CHEM IND
Classification:
- international: C08G63/06; C12P7/62
- european:
Application number: JP19910178518 19910718
Priority number(s): JP19910178518 19910718

[Report a data error here](#)

Abstract of JP5023189

PURPOSE: To obtain the subject copolymer having excellent bio-degradability and bio-compatibility and useful for surgical suture, etc., by proliferating a specific microbial strain capable of producing poly-3-hydroxybutyrate while continuously supplying a nutrient source containing a carbon source and a nitrogen source at a specific weight ratio. **CONSTITUTION:** The objective polyester copolymer can be produced by proliferating a microbial strain of genus *Alcaligenes* capable of producing poly-3-hydroxybutyrate [e.g. *Alcaligenes eutrophus* H16 (ATCC 17699)] while continuously supplying a nutrient source containing gamma-butyrolactone and fructose as a carbon source and having a (carbon source/nitrogen source) weight ratio C/N of $8 \leq C/N \leq 45$, collecting the microbial cells from the cultured product, washing with distilled water and then acetone, drying under reduced pressure, extracting the dried cells with hot chloroform, adding hexane to the extracted liquid, separating the precipitated copolymer by filtration and drying the product.

.....
Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-23189

(43) 公開日 平成5年(1993)2月2日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/62		8114-4B		
C 0 8 G 63/06	N L P	7211-4J		
# (C 1 2 P 7/62				
C 1 2 R E 05)				

審査請求 未請求 請求項の数3 (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平3-178518

(22) 出願日 平成3年(1991)7月18日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成3年6月10日
 社団法人高分子学会発行の「高分子学会予稿集40巻3
 号」において文書をもつて発表

(71) 出願人 000005908

三菱化成株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 土肥 義治

神奈川県横浜市旭区今宿町2617-30

(72) 発明者 小山 直之

東京都府中市北山町4-1-2-308

(72) 発明者 平光 昌弥

岐阜県岐阜市京町3-7

(74) 代理人 弁理士 長谷川 一 (外1名)

(54) 【発明の名称】 ポリエステル共重合体の製造方法

(57) 【要約】

【目的】 3-ヒドロキシブチレート単位と4-ヒドロキシブチレート単位を含有するポリエステル共重合体を微生物を用いて連続的に、高収率で得るための方法に関する。得られるポリエステルは、生物分解性と生体適合性を示し、手術糸などの医用材料や徐放性システムなどに用いられる。

【構成】 ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するアルカリゲネス属菌を、栄養源の連続供給下に増殖させると同時に、該菌体内において3-ヒドロキシブチレート単位および4-ヒドロキシブチレート単位からなるポリエステル共重合体を製造する方法において、供給栄養源中の炭素源と窒素源の重量比率 (C/N) を、 $8 \leq C/N \leq 45$ の範囲とすることを特徴とする、ポリエステル共重合体の製造方法。

【免許請求の時期】

【請求項1】 ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するアルカリゲネス菌を、栄養源の連続供給下に増殖させると同時に、該菌体内において3-ヒドロキシブチレート単位および4-ヒドロキシブチレート単位からなるポリエステル共重合体を製造する方法において、供給栄養源中の炭素源と窒素源の重量比率（C/N）を、 $8 \leq C/N \leq 45$ の範囲とすることを特徴とする、ポリエステル共重合体の製造方法。

【請求項2】 炭素源として、γ-ブチロラクトンおよびブクトースを使用し、かつ炭素源と窒素源の重量比率（C/N）を $8 \leq C/N \leq 25$ の範囲とすることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のポリエステル共重合体の製造方法。

【請求項3】 炭素源として、γ-ブチロラクトンおよび酪酸を使用し、かつ炭素源と窒素源の重量比率（C/N）を $8 \leq C/N \leq 45$ の範囲とすることを特徴とする、特許請求の範囲第1項記載のポリエステル共重合体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

100011

【産業上の利用分野】本発明は、3-ヒドロキシブチレート単位（以下3HB単位と記す）と4-ヒドロキシブチレート単位（以下4HB単位と記す）を含有する共重合体の製造方法に関する。詳しくは、本発明は、ポリエステルを基質で育つ微生物を用いて製造される、3HB単位及び4HB単位からなるポリエステル共重合体の製造方法に関する。

100021

【従来の技術】ポリ- γ -ヒドロキシブチレート (PHB) は、エネルギー貯蔵物質として数多くの微生物の菌体内に蓄積され、優れた生物分解性と生体適合性を示す熱可塑性高分子であることから、環境を保全する“クリーン”プラスチックとして注目され、手術糸や骨折固定用材などの医用材料、医薬や農薬を徐々に放出する徐放性システムなどの多方面への応用が長年にわたり期待されてきた。特に近年、合成プラスチックが環境汚染や資源循環の観点から深刻な社会問題となるに至り、PHBは石油に依存しないバイオポリマーとして注目されている。しかしながら、PHBは耐衝撃性に劣る等の物性上の問題とともに、生産コストが高いことから、工業的生産が見送られてきた。

100031

【発明が解決しようとする課題】近時、3HB単位および3-ヒドロキシバリレート単位（以下3HV単位と記す）を含有する共重合体およびその製造法について、研究、開発がなされている（たとえば、特開昭57-15,0393号公報および特開昭59-2,20192号公報参照）。しかしながら、共重合体の3HV単位が0から

(Tm) が 180°C から 85°C まで急激に低下することが知られており [T. L. Bluhm et al., *Macromolecules*, **19**, 2871 (1985)], そのため, 3HV 単位含有率の高い共重合体は耐熱性に欠いていた。

【0004】一方、本発明者らは、3HB単位および4HB単位を含有する共重合体およびその製造法について研究を行い、先に公開した(特開平1-48821、特開平1-222788、特開平1-304891、特開平2-27992、特開平2-234683)。この共重合体は、4HB単位の共重合成分含有率が高い場合でも、高い融点を有することから工業的な価値は高い。

【0005】しかしながら、該共重合体の製造方法は、前段で菌体を増殖させ、後段で該菌体を窒素あるいはリンの制限下、炭素源を加えて該菌体内に共重合体を蓄積させる2段の製造方法であった。しかし、工業的生産を考へる場合、菌体の増殖と共重合体の蓄積を同時に行い、連続的に生産物を得られることが望ましい。それ故、連続法による共重合体の製造方法の確立が望まれていた。

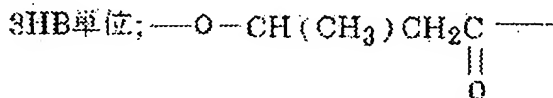
(0-306)

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上述の点に鑑み、3HB単位および4HB単位からなる共重合体を工業的に有利にかつ容易に製造すべく鋭意検討した結果、炭素源と窒素源の比率C/Nが $8 \leq C/N \leq 45$ の範囲にある基質を系内に徐々に添加することにより、効率的に菌体を増殖させながら共重合体を蓄積させることができ、従って菌増殖とポリマー生成を同時に行なうことによって、ポリエステル共重合体を連続的に製造することができることを見出し、本発明に到着した。

【0007】すなわち本発明は、ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能と有するアルカリゲネス属菌を、増殖させると同時に該菌体内において3-ヒドロキシブチレート単位および4-ヒドロキシブチレート単位からなるポリエステル共重合体を製造する方法において、供給栄養源中の炭素源と窒素源の重量比率C/Nを $8 \leq C/N \leq 45$ の範囲とすることを特徴とする3-ヒドロキシブチレート単位および4-ヒドロキシブチレート単位からなるポリエステル共重合体の製造方法に存する。以下、本発明を詳細に説明する。本発明において、共重合体に含有される3HB単位および4HB単位はそれぞれ次式であらわされる。

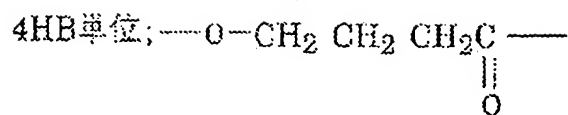
100081

[[1]]



3

4



【0009】本発明で使用する微生物は、PHB生産能を有する微生物であれば特に制限はないが、実用上はたとえば、アルカリゲネス フェカリス (*Alcaligenes faecalis*)、アルカリゲネスルーランディイ (*Alcaligenes ruhlandii*)、アルカリゲネスラタス (*Alcaligenes latus*)、アルカリゲネス アクアマリヌス (*Alcaligenes aquamarinus*) およびアルカリゲネス ユウトロフス (*Alcaligenes eutrophus*) 等のアルカリゲネス属などがある。

【0010】これらの属種に属する菌株の代表例として、アルカリゲネス フェカリス ATCC8750、アルカリゲネス ルーランディイ ATCC16749、アルカリゲネス ラタス ATCC29712、アルカリゲネス アクアマリヌス ATCC14400 ならびにアルカリゲネス ユウトロフス H-16 ATCC17699 およびこの H-16 株の突然変異株であるアルカリゲネス ユウトロフス NCIB11597、同 NCIB11598、同 NCIB11599、同 NCIB11600 などを挙げる事ができる。これらのうち、実用上、アルカリゲネス ユウトロフス H-16 ATCC17699 およびアルカリゲネス ユウトロフス NCIB11599 が特に好ましい。

【0011】アルカリゲネス属に属するこれらの微生物の菌学的性質は、たとえば、“BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY: Eighth Edition, The Williams & Wilkins Company/Baltimore” に、また、アルカリゲネス ユウトロフス H-16 の菌学的性質は、たとえば、“J. Gen. Microbiol., 115, 185~192 (1979) にそれぞれ記載されている。

【0012】これらの微生物は、所定量の炭素源と窒素源からなる栄養源（基質）を、徐々に連続的に供給することにより培養される。本発明の培養法は、微生物を増殖させる為の通常の培養法を適用することができる。すなわち、使用する微生物が増殖し得る培地および培養条件を採用すればよい。培地成分は、使用する微生物を資化し得る物質であれば特に制限はないが、実用上は、炭素源としては、たとえば、メタノール、エタノールおよび酢酸などの合成炭素源、二酸化炭素などの無機炭素源、酵母エキス、糖蜜、ペプトンおよび肉エキスなどの天然物、アラビノース、グルコース、マンノース、フラクトースおよびガラクトースなどの糖類から7Xニールド

特に好ましいのは、フラクトース、γ-ブチロラクトン、または酪酸である。

【0013】窒素源としては、たとえば、アンモニア、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物および/または、たとえば、尿素、コーン・ステープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、硫酸アンモニウムなどの窒素含有物である。また、これらに加えて、無機成分として、たとえば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩、ニッケル塩、クロム塩、ほう素化合物およびよう素化合物などが用いられる。特に好ましくは、リン酸水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム、硫酸マグネシウムなどである。

【0014】また、必要に応じて、ビタミン類なども使用することができる。培養条件としては、温度は、たとえば、20~40°C 程度、好ましくは 25~35°C 程度とされ、また、pH は、たとえば、6~10 程度、好ましくは 6.5~9.5 程度とされる。このような条件で好氣的に培養する。これらの条件をはずして培養した場合には、微生物の増殖は比較的悪くなるが、これらの条件をはずして培養することを妨げない。培養方式は、回分培養または連続培養いずれでもよいが、工業的には、連続培養がプロセス的に好ましい。

【0015】本発明においては、供給栄養源中の炭素源と窒素源の重量比率 C/N が、 $8 \leq C/N \leq 45$ の範囲にあることが特徴である。そのうちでも特に、炭素源として γ-ブチロラクトン及びフラクトースを併用し、かつ C/N を $8 \leq C/N \leq 25$ 、好ましくは $12 \leq C/N \leq 16$ の範囲とする方法が、ポリエステル共重合体の生産量を高める上で、好ましい。また、炭素源として、γ-ブチロラクトン及び酪酸を併用し、かつ C/N を $8 \leq C/N \leq 45$ 、好ましくは、 $18 \leq C/N \leq 22$ の範囲とする方法も、生産量向上の点から好ましい。

【0016】本発明においては具体的には、炭素源の供給速度は、 $0.2 \sim 5 \text{ g/h} \cdot \text{l}$ で行なわれる。特に $0.5 \sim 2.0 \text{ g/h} \cdot \text{l}$ が好ましい。窒素源の供給速度は、上記炭素源の供給速度に応じて、 $8 \leq C/N \leq 45$ の範囲を保つように行なわれる。C/N が上記範囲より大きい場合には、菌体の増殖が十分でなく、結果として共重合体の収率が低くなり、好ましくない。また C/N が上記範囲より小さい場合には、菌体の増殖の方に炭素源が消費され、結果として、共重合体の収率が低下する。

【0017】このように培養して得られた培養液から、濾過および遠心分離などの通常の固液分離手段によって菌体を分離回収し、この菌体を洗浄、乾燥して乾燥菌体を得、この乾燥菌体から、常法により、たとえば、クロロホルムなどの有機溶媒で抽出された共重合体を抽出

5

6

を加えて、共重合体を沈澱させる。

【0018】

【実施例】本発明を、実施例によりさらに具体的に説明する。なお、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

実施例1～6及び比較例1～2

* 【0019】

培地の組成

0.5M	りん酸水素カリウム水溶液	15ml
0.25M	りん酸水素二ナトリウム水溶液	124ml
20wt/V%	硫酸マグネシウム水溶液	1.0ml
	炭素源*	
	ミネラル溶液**	1.0ml

* 炭素源として後記表1に記した様な種々の化合物を用いた。

** ミネラル溶液としては、以下の無機物質を0.1N-HCl 1リットルに溶解したものをを用いた。

CoCl ₂	119.0mg
FeCl ₃	9.7g
CaCl ₂	7.8g
NiCl ₂	118.0mg
CrCl ₃	62.2mg
CaSO ₄	156.4mg

【0020】①炭素源及び窒素源の供給：上記培地に菌体を加え、以下の条件で、炭素源及び窒素源を供給した。

炭素源：γ-ブチロラクトン：フルクトース＝1：1（重量比）

窒素源 = 硫酸アンモニウム

炭素源滴下速度 = 1.0 (g/h・l)

C/N = 5, 10, 13, 9, 20 (g/g)

pH = 7.5

Temp. = 30°C

培養時間 = 48hr

あるいは、

炭素源：γ-ブチロラクトン：酪酸＝1：1（重量比）

窒素源 = 硫酸アンモニウム

炭素源滴下速度 = 0.8 g/h・l

C/N = 5, 10, 20, 40 (g/g)

*アルカリゲネス ユウトロフスH16 (ATCC17699) を使用して、以下に示す工程により共重合体を製造した。すなわち、

①培地の調整：以下に示す組成の培地成分を脱イオン水に溶解して1リットルとし、pH7.5に調整した。

* 【0019】

g)

pH = 7.5

Temp. = 30°C

【0021】③菌体の処理：上述の培養で得られた菌体を蒸留水で洗浄し、引続きアセトンで洗浄し、これを減圧乾燥（20°C、0.1mmHg）して乾燥菌体を得た。

20 ④共重合体の分離回収：このようにして得られた乾燥菌体から熱クロロホルムで共重合体を抽出し、この抽出液にヘキサンを加えて共重合体を沈澱させ、この沈澱を濾取、乾燥して表1に示す量の共重合体を得た。

【0022】⑤共重合体の物性測定：このようにして得られた共重合体の組成、数平均分子量等をつぎのようにして測定した。すなわち、

組成 : ¹H-NMR 100MHz スペクトルによる。

分子量 : GPCによる。（クロロホルム溶媒、Shodex 80Mカラム、RI-ディテクター。）

乾燥菌体重量 : 遠心分離により集菌したものを凍結乾燥した。

ポリエステル含量 : 乾燥菌体中のポリエステル含量。

組成 : 3HB単位と4HB単位のモル比を¹H-NMRより求めた。

結果を表1に示す。

【0023】

【表1】

	試 験 標	C/N (g/g)	乾燥固形物量 (g/l)	ポリエステル含量 (重量%)	組成 (モル%)		分子量 M_n ($\times 10^3$)
					3HB	4HB	
実施例 1	α-ブチロラクトン フラクトース	13.9	11.7	59	92.9	7.1	600
2	・	10	12.5	33	93.3	6.7	450
3	・	20	10.6	36	93.5	6.5	500
比較例 1	α-ブチロラクトン フラクトース	5	13	9	93.2	6.8	400
4	α-ブチロラクトン 糖 類	20	13	75	92	8	70
5	・	10	13	58	87	13	110
6	・	40	11.5	78	98	2	50
2	α-ブチロラクトン 糖 類	5	15	27	96	4	50

[0024]

【発明の効果】本発明によれば3HB単位と4HB単位を含有するポリエステル共重合体を連続的に、高収率に得ることができる。本発明の方法で得られた共重合体

は、優れた種々の特性を有しているで、手術糸および骨折固定用材などの医用材料の原料として極めて好適であり、また、徐放性システムへの利用などの多方面への応用が期待される。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.